

24. 3. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 8 1 1 4 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 8 1 1 4 7]

出 願 人 持 立 克 身
Applicant(s): 独 立 行 政 法 人 国 立 環 境 研 究 所

REC'D 21 MAY 2004

WIPO

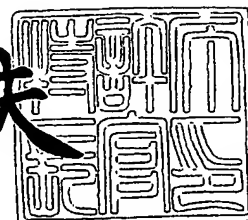
PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 2003P1587

【提出日】 平成15年 3月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 5/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市竹園 3-108-404

 【氏名】 持立 克身

【特許出願人】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市竹園 3-108-404

 【氏名又は名称】 持立 克身

【代理人】

 【識別番号】 100107984

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 044347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞接着ペプチドの固相化標品

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞接着ペプチドが、疎水結合性吸着ポリマーを介して細胞培養基質に接着していることを特徴とする細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項 2】 細胞接着ペプチドが、疎水結合性吸着ポリマーと該ポリマー分子内のペプチドと反応しうる官能基と反応し結合している請求項 1 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項 3】 細胞接着ペプチドが、細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドである請求項 1 または 2 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項 4】 細胞接着蛋白質が、フィブロネクチン (FN)、コラーゲン (Col)、ラミニン (LN) またはビトロネクチン (VN) である請求項 3 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項 5】 フィブロネクチン (FN) 蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドが、細胞側のインテグリン受容体と結合する特異的な RGD アミノ酸配列を有するペプチドである請求項 4 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項 6】 RGD アミノ酸配列を有するペプチドが、Tyr-Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser (FIB-1) である請求項 5 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項 7】 ラミニン (LN) 蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドが、 α 鎖の G 領域 (G-domain) ペプチドである請求項 4 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項 8】 G 領域ペプチドが、Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr (AG73)、Leu-Gln-Gln-Arg-Arg-Ser-Val-Leu-Arg-Thr-Lys-Ile (AG73T)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Met (AG81.5)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-L

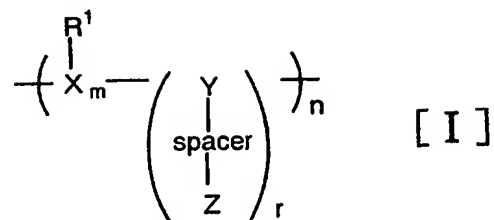
Lys-Ala-Phe-Nle (AG81.5X)、Lys-Asn-Arg-Leu-Thr-Ile-Glu-Leu-Glu-Val-Arg-Thr (A2, A2G73)、Lys-Pro-Arg-Leu-Gln-Phe-Ser-Leu-Asp-Ile-Gln-Thr (A3G72)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (A4G82)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Nle (A4G82X)、Gly-Pro-Leu-Pro-Ser-Tyr-Leu-Gln-Phe-Val-Gly-Ile (A5G71)、Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Met-Leu-Val-Arg-Pro (A5G73)、Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Nle-Leu-Val-Arg-Pro (A5G73X)、Leu-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His-Phe-Val-Ala (A5G77)、Leu-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His (A5G77f)、Lys-Asn-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Tyr-Leu-Ser-Lys-Gly (hA3G75) または Gly-Asn-Ser-Thr-Ile-Ser-Ile-Arg-Ala-Pro-Val-Tyr (hA3G83) である請求項7記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項9】 細胞接着ペプチドが、3～20個のアミノ酸残基からなるペプチドである請求項3記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項10】 疎水結合性吸着ポリマーが、分子内に疎水性を有する直鎖状骨格とペプチドと反応しうる官能基とを有しているポリマーである請求項1記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項11】 疎水結合性吸着ポリマーが、以下の一般式 [I] で表される請求項10記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【化1】



(式中、XはCHまたはNHCHCOを示し、YはCHまたはNCR²COを示し、R¹はH、炭素数1～3のアルキル基、炭素数1～3のアルコキシ基、炭素数6～8のアリールまたはアラアルキル基または炭素数6～8のアリールオキシまたはアラアルキルオキシ基を示し、R²はHまたは炭素数1～3のアルキル基を示し、Zは官能基(反応基)を示し相互に結合してもよく、spacerは(—CH₂—CH₂—)_pまたは(—NHCHR³CO—)_qを示し、R³はHまたは炭素数1～3のアルキル基を示し、mは1以上の整数を、nは100～20000の整数を、pおよびqは独立して0または1～8の整数を、rは1以上の整数を示す)

【請求項12】 一般式【I】で表される疎水結合性吸着ポリマーが、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体である請求項11記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項13】 細胞培養基質が、生物性ポリマー、プラスチック、天然または合成ゴム、無機物または金属を基材とした請求項1または2記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項14】 細胞培養基質に吸着させた疎水結合性吸着ポリマーのペプチドと反応しうる官能基と細胞接着ペプチドとを反応させることにより調製される請求項1または2記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項15】 疎水結合性吸着ポリマーのペプチドと反応しうる官能基と細胞接着ペプチドとを反応させ、該反応物を細胞培養基質に塗布することにより調製される請求項1または2記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【請求項16】 疎水結合性吸着ポリマーのペプチドと反応しうる官能基と細胞接着ペプチドとを反応させて得られる反応物。

【請求項 17】 請求項 1～15 のいずれか記載の細胞接着ペプチドの固相化標品上に所定の接着受容体を有する細胞を播種し、培養することにより調製されることを特徴とする人工組織。

【請求項 18】 所定の接着受容体を有する細胞が、上皮細胞、内皮細胞または間充織細胞である請求項 17 記載の人工組織

【請求項 19】 上皮細胞が、表皮細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子球体上皮細胞または肝実質細胞である請求項 18 記載の人工組織。

【請求項 20】 内皮細胞が、腎臓子球体毛細胞、血管内皮細胞、肺動脈血管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞または大動脈血管内皮細胞である請求項 18 記載の人工組織。

【請求項 21】 間充織細胞が、筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン細胞または神経細胞（ニューロン）である請求項 19 記載の人工組織。

【請求項 22】 人工組織が、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎系球体組織、人工肝実質組織もしくは人工血管内皮組織、または人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚もしくは人工角膜である請求項 17～21 記載の人工組織。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞培養基質表面に疎水結合性吸着ポリマーを介して接着した細胞接着ペプチドの固相化標品、および、該細胞接着ペプチドの固相化標品上に接着受容体を有する細胞を播種し、培養することにより調製される人工組織に関する。

。

【0002】

【従来の技術】

動物の体の内外の表面を覆っている細胞層である表皮、角膜上皮、肺胞上皮、消化器系の粘膜上皮、腎臓子球体上皮、肝実質細胞等の上皮組織は、外界から異物（微生物、アレルゲン、化学物質等）が侵入するのを防いでいる。かかる上皮

組織を構成する上皮細胞の外界面は上端面 (apical surface)、内側下面は基底面 (basal surface) と呼ばれ、かかる基底面直下には、蛋白質やプロテオグリカン等の細胞外基質 (ECM) から成る細胞を含まない基底膜と呼ばれる 50 ~ 100 nm の薄膜の構造体が存在する。基底膜は、未成熟な上皮細胞が増殖し、成熟した細胞に分化して、本来の形態や、機能を発現するのに必須の構造体と考えられている。即ち、基底膜なしでは上皮組織は自分自身の維持や本来のパフォーマンスが達成できない。多層または単層の上皮細胞層はバリアーとして外界からの異物の侵入を防いでいるが、基底膜自体も物理的なバリアーとして作用する。このように、上皮組織を構成する上皮細胞と基底膜が協働して、強固なバリアーを形成し、体内の生命活動を保護している。

【0003】

上皮細胞の他、内皮細胞、筋細胞、脂肪細胞、シュワン細胞などの実質細胞と結合組織との界面に形成される細胞外基質の特異な膜状構造物である基底膜は、生体の各組織・臓器に普遍的に見い出される一方で、腎糸球体毛細血管ループや神経シナプス膜など高度に特化したものもある。したがって、細胞を間質に接着させるだけでなく、選択的な物質・細胞透過や細胞分化の誘導等の機能が明らかにされている。腎糸球体では、基底膜の陰性荷電が腎のろ過機能を担っているとみなされ、その陰性荷電は現在パールカンとよばれるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) によることが古典的に知られている。HSPG は腎糸球体基底膜だけでなく、種々の基底膜に、IV 型コラーゲン、ラミニン、エンタクチン (ニドジェン) 等と同様に、その基本的構成分子として広く分布している。

【0004】

細胞外マトリックス、特に基底膜は、上記のように個体の発生や分化等の生理現象だけでなく、癌の増殖転移や炎症などの病態形成にも深く関与していることが明らかとなりつつあり、その構成タンパク質の機能の解明が重要な課題となってきた。例えば、基底膜の主要糖タンパク質であるラミニンは、 α 、 β 、 γ の 3 種類のサブユニットからなる複合体で、15 種類のアイソフォームが知られており、これらが組織特異的あるいは発生時の各段階で特異的に発現している。ラミニンは様々な生物活性を有している分子量 90 万の複雑な巨大分子である。

ラミニンのリセプターとしては、 $\alpha 6 \beta 1$ 等のインテグリン分子、 α -ジストグリカン (α -DG)、シンデカン-1~4のヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が報告されている。

【0005】

細胞が接着可能な薄い細胞外マトリックス層である基底膜の構成成分と上皮細胞との相互作用が、移動、増殖および分化等の細胞機能に影響を及ぼしている（例えば、非特許文献1参照。）。基底膜の主要成分としては、前記のように、ラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) およびエンタクチン (ニドジェン) が知られており（例えば、非特許文献2参照。）、ラミニン及びIV型コラーゲンのアイソフォームを含む基底膜成分の合成には、間充織細胞が重要な役割を担っていると考えられている（例えば、非特許文献3、4参照。）が、上皮細胞の役割もまた、重要なものである。HSPGは、上皮細胞由来と考えられているが、ラミニン、IV型コラーゲンおよびエンタクチン (ニドジェン) は、上皮細胞および間充織細胞の双方によって、インビボで合成される（例えば、非特許文献5、6参照。）。連続した緻密層 (lamina densa) を示すインビトロでの上皮組織モデルを作製する試みが、今まで数多く行われてきた。腸（例えば、非特許文献7参照。）および皮膚（例えば、非特許文献8、9、10参照。）等の組織モデルが研究されており、いくつかの間充織細胞由来基底膜成分が、基底膜形成に重要な役割を果たしていることも見い出されている。

【0006】

従来から、上皮細胞を培養することにより基底膜を構築し、基底面直下に基底膜構造体が存する上皮組織を構築する幾つかの方法が報告されている。例えば、本発明者は、肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との共培養によりインビトロで基底膜が形成されることを報告した（例えば、非特許文献11参照。）。すなわち、肺線維芽細胞をI型コラーゲンゲルに包埋した状態で培養すると、肺線維芽細胞によってコラーゲンゲルは収縮し、堅さを増す。また、肺線維芽細胞から分泌された細胞外基質は、細胞周囲のコラーゲン線維にまとわりついて沈着する。その形成物はインビボにおける間質と類似することから、擬似間質と呼ぶことができる。肺線維芽細胞からは、ラミニン、IV型コラーゲン、パールカン、エンタクチン（

ニドジェン)等の基底膜構成成分も、培地中に分泌される。この擬似間質化したI型コラーゲン線維上で、肺胞II型上皮細胞株(SV40-T2)を14日間程度培養する(T2-Fig 1)と、肺線維芽細胞から分泌された基底膜構成成分が、上記肺II型上皮細胞株の基底面にまで拡散・到達し、基底膜構築の材料として使われる結果、基底膜構造体が形成されることを報告した。

【0007】

また、希薄な中性コラーゲン溶液を、5%CO₂中37℃でインキュベートし、コラーゲン線維を形成させた後、無菌状態の中で風を当てて乾燥させた風乾コラーゲン線維基質(fib)を、上記擬似間質の代替物として用い、上記肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との共培養の場合と同様にして、基底膜を形成することも報告されている(例えば、非特許文献12、13参照。)。この方法の場合、コラーゲン溶液の濃度が高いと、形成されたコラーゲン線維に隙間が少なく、あるいは無くなって、基底膜形成のため上皮細胞を長期間培養(10日~2週間)すると、細胞が剥がれて浮き上がることから(例:Becton Dickinson, Fibrillar collagen coat culture insert)、コラーゲン溶液濃度は、0.3~0.5mg/mlが最適であるとされている(例えば、非特許文献12、13参照。)。

【0008】

線維芽細胞を包埋したコラーゲンマトリックスを使用する代わりに、マトリゲル(Matrigel; Becton Dickinson社の登録商標)を共存させ、コラーゲン線維基質上で肺胞II型上皮細胞株(SV40-T2)を培養した。このときマトリゲルは、基底膜成分の外來性(exogenous)供給源として機能した。マトリゲルは、Engelbreth-Holm-Swarm腫瘍マトリックスから抽出された基底膜調製物であり(例えば、非特許文献14参照。)、ECM合成に影響を及ぼす可能性のある種々のサイトカインの他に、ラミニン-1、エンタクチン(ニドジェン)、IV型コラーゲン、パールカンを含んでいる(例えば、非特許文献15参照。)。基底膜に取り込まれたマトリゲル由来の成分を追跡するために、マトリゲルをビオチンで標識した。標識された基底膜成分の中でも、主としてラミニン-1とエンタクチン(ニドジェン)が培地中に拡散し、肺胞上皮細胞が形成する基底膜中に取り込まれた。また、基底膜成分を免疫蛍光染色し(蛍光)顕微鏡で観察すると、マトリ

ゲル量に依存して基底膜形成が促進すること、および点状に分泌・沈着された基底膜マトリックス成分がシート状に拡大し、やがて基底膜へと発達して行く過程が観察された。これらの結果から、肺胞上皮細胞の基底面下方から供給された外来性ラミニン-1 およびエンタクチン（ニドジェン）が、インビトロでの上記上皮細胞による完全な基底膜の形成に大きく関与していることが明らかになっている（例えば、非特許文献13参照。）。

また、細胞をインビトロで付着させ、培養する方法として、疎水性組織培養表面に生体分子を結合させた末端基活性化ポリマー（EGAP）に吸着させ、細胞を生体分子が結合したEGAPコート表面上に播種し、増殖させる方法が開示されている（特許文献1）。

【0009】

【非特許文献1】

Crouch et al., Basement membrane. .In The Lung(ed .R. G. Crystal and J. B. West), pp53.1-53.23. Philadelphia : Lippincott-Raven. 1996

【非特許文献2】

Curr. Opin. Cell Biol. 6, 674-681, 1994

【非特許文献3】

Matrix Biol. 14, 209-211, 1994

【非特許文献4】

J. Biol. Chem. 268, 26033-26036, 1993

【非特許文献5】

Development 120, 2003-2014, 1994

【非特許文献6】

Gastroenterology 102, 1835-1845, 1992

【非特許文献7】

J. Cell Biol. 133, 417-430, 1996

【非特許文献8】

J. Invest. Dermatol. 105, 597-601, 1995

【非特許文献9】

J. Invest. Dermatol. 109, 527-533, 1997

【非特許文献 1 0】

Dev. Dynam. 197, 255-267, 1993

【非特許文献 1 1】

Cell Struc. Func., 22: 603-614, 1997

【非特許文献 1 2】

Eur. J. Cell Biol., 78: 867-875, 1999

【非特許文献 1 3】

J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000

【非特許文献 1 4】

J. Exp. Med. 145, 204-220, 1977

【非特許文献 1 5】

Exp. Cell Res. 202, 1-8, 1992

【非特許文献 1 1】

Clement et al., Exp. Cell Res., 196: 198-205, 1991

【特許文献 1】

特表 2 0 0 1 - 5 1 2 5 6 5

【0 0 1 0】

【発明が解決しようとする課題】

細胞接着蛋白質には、代表的なものとしてフィブロネクチン（FN）、コラーゲン（C o l）、ラミニン（LN）およびビトロネクチン（VN）等が知られている。これらの蛋白質は、プラスチック培養皿との疎水結合を利用して、非共有結合で吸着させ、これらの上に上皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞等を播種させ、細胞培養を行うための基質として利用されている。しかし、細胞接着蛋白質は高価な上、蛋白質の一般的性質である変成や分解をうけ易く、価格、安定性や保存性等に問題を有している。

【0 0 1 1】

また、細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドを上記と同様の方法を用いてプラスチック培養皿に吸着させ、細胞培養の基質

として用いることが出来る。接着蛋白質に比して、容易に化学合成できるペプチドを接着ペプチドとして用いる方法は、大量生産が容易である点や、構造が比較的安定なことから、細胞接着基質に用いる利点がある。しかし、低分子故にその吸着効率はたんぱく質に比して著しく低く、数パーセント程度しか吸着しない。また、ペプチドにとっても、プラスチックに吸着されて運動の自由度を奪われている状態では、細胞側の受容体と結合するのが難しい。また、一旦吸着したペプチドも、その後、徐々に遊離する。従って、ペプチドを用いた細胞接着の再現性は芳しく悪く、工業製品としての価値は低い。

本発明は、培養皿等の細胞培養基質に効率よく吸着し、細胞接着の再現性に優れた細胞接着ペプチドの固相化標品、および、該細胞接着ペプチドの固相化標品上に細胞を播種し、培養することにより調製される人工組織を提供することにある。

【0012】

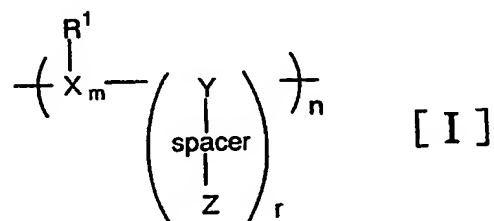
【課題を解決するための手段】

本発明は、細胞接着ペプチドが、疎水結合性吸着ポリマーを介して細胞培養基質に接着していることを特徴とする細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項1）や、細胞接着ペプチドが、疎水結合性吸着ポリマーと該ポリマー分子内のペプチドと反応しうる官能基と反応し結合している請求項1記載の細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項2）や、細胞接着ペプチドが、細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドである請求項1または2記載の細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項3）や、細胞接着蛋白質が、フィブロネクチン（FN）、コラーゲン（Col）、ラミニン（LN）またはビトロネクチン（VN）である請求項3記載の細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項4）や、フィブロネクチン（FN）蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドが、細胞側のインテグリン受容体と結合する特異的なRGDアミノ酸配列を有するペプチドである請求項4記載の細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項5）や、RGDアミノ酸配列を有するペプチドが、Tyr-Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser（FIB-1）である請求項5記載の細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項6）や、ラミニン（LN）

蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドが、 α 鎖のG領域 (G-domain) ペプチドである請求項4記載の細胞接着ペプチドの固相化標品 (請求項7) や、G領域ペプチドが、Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr (AG73)、Leu-Gln-Gln-Arg-Arg-Ser-Val-Leu-Arg-Thr-Lys-Ile (AG73T)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Met (AG81.5)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Nle (AG81.5X)、Lys-Asn-Arg-Leu-Thr-Ile-Glu-Leu-Glu-Val-Arg-Thr (A2, A2G73)、Lys-Pro-Arg-Leu-Gln-Phe-Ser-Leu-Asp-Ile-Gln-Thr (A3G72)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (A4G82)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Nle (A4G82X)、Gly-Pro-Leu-Pro-Ser-Tyr-Leu-Gln-Phe-Val-Gly-Ile (A5G71)、Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Met-Leu-Val-Arg-Pro (A5G73)、Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Nle-Leu-Val-Arg-Pro (A5G73X)、Leu-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His-Phe-Val-Ala (A5G77)、Leu-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His (A5G77f)、Lys-Asn-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Tyr-Leu-Ser-Lys-Gly (hA3G75) またはGly-Asn-Ser-Thr-Ile-Ser-Ile-Arg-Ala-Pro-Val-Tyr (hA3G83) である請求項7記載の細胞接着ペプチドの固相化標品 (請求項8) や、細胞接着ペプチドが、3~20個のアミノ酸残基からなるペプチドである請求項3記載の細胞接着ペプチドの固相化標品 (請求項9) や、疎水結合性吸着ポリマーが、分子内に疎水性を有する直鎖状骨格とペプチドと反応しうる官能基と

を有しているポリマーである請求項 1 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項 10）や、疎水結合性吸着ポリマーが、以下の一般式 [I] で表される請求項 10 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品。

【化 2】



（式中、XはCHまたはNHCHCOを示し、YはCHまたはNCR²COを示し、R¹はH、炭素数1～3のアルキル基、炭素数1～3のアルコキシ基、炭素数6～8のアリールまたはアラアルキル基または炭素数6～8のアリールオキシまたはアラアルキルオキシ基を示し、R²はHまたは炭素数1～3のアルキル基を示し、Zは官能基（反応基）を示し相互に結合してもよく、spacerは（-CH₂-CH₂-）_pまたは（-NHCHR³CO-）_qを示し、R³はHまたは炭素数1～3のアルキル基を示し、mは1以上の整数を、nは100～20000の整数を、pおよびqは独立して0または1～8の整数を、rは1以上の整数を示す）（請求項 11）や、一般式 [I] で表される疎水結合性吸着ポリマーが、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体である請求項 11 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項 12）や、細胞培養基質が、生物性ポリマー、プラスチック、天然または合成ゴム、無機物または金属を基材とした請求項 1 または 2 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項 13）や、細胞培養基質に吸着させた疎水結合性吸着ポリマーのペプチドと反応しうる官能基と細胞接着ペプチドとを反応させることにより調製される請求項 1 または 2 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項 14）や、疎水結合性吸着ポリマーのペプチドと反応しうる官能基と細胞接着ペプチドとを反応させ、該反応物を細胞培養基質に塗布することにより調製される請求項 1 または 2 記載の細胞接着ペプチドの固相化標品（請求項 15）や、疎水結合性吸着ポリマーのペプチドと反応しうる官能基と

細胞接着ペプチドとを反応させて得られる反応物（請求項 16）に関する。

【0013】

さらに本発明は、請求項 1～15 のいずれか記載の細胞接着ペプチドの固相化標品上に所定の接着受容体を有する細胞を播種し、培養することにより調製されることを特徴とする人工組織（請求項 17）や、所定の接着受容体を有する細胞が、上皮細胞、内皮細胞または間充織細胞である請求項 17 記載の人工組織（請求項 18）や、上皮細胞が、表皮細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子球体上皮細胞または肝実質細胞である請求項 18 記載の人工組織（請求項 19）や、内皮細胞が、腎臓子球体毛細胞、血管内皮細胞、肺動脈血管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞または大動脈血管内皮細胞である請求項 18 記載の人工組織（請求項 20）や、間充織細胞が、筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン細胞または神経細胞（ニューロン）である請求項 18 記載の人工組織（請求項 21）や、人工組織が、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎糸球体組織、人工肝実質組織もしくは人工血管内皮組織、または人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚もしくは人工角膜である請求項 17～21 記載の人工組織（請求項 22）に関する。

【0014】

【発明の実施の形態】

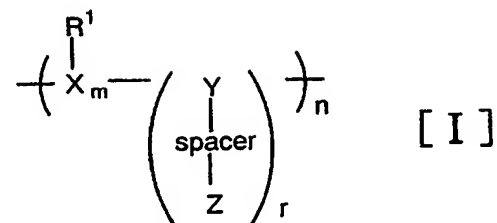
本発明の細胞接着ペプチドとしては、細胞接着蛋白質のアミノ酸配列の中で、細胞接着に関わる領域のペプチドであればいずれでも用いることができ、細胞接着蛋白質としては、例えば、フィブロネクチン（FN）、コラーゲン（Col）、ラミニン（LN）またはビトロネクチン（VN）等が挙げられる。これらペプチドの長さとしては、3～20 個、好ましくは 8～15 個、より好ましくは 9～12 個のアミノ酸残基である。FN 蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドとしては、細胞側のインテグリン受容体と結合する特異的な RGD アミノ酸配列を有するペプチドが好ましく、例えば、具体的配列として、Tyr-Ala-Val-I-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser（FIB-1）が例示される。また、上皮細胞、血管内皮細胞、筋肉細胞、神

経細胞等の機能発現に特に重要と考えられているLN蛋白質の細胞接着に関わる領域のペプチドとしては、 α 鎖のG領域(G-domain)ペプチドが好ましく、例えば、マウスのLN由来である、Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr (AG73)、Leu-Gln-Gln-Arg-Arg-Ser-Val-Leu-Arg-Thr-Lys-Ile (AG73T)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Met (AG81.5)、Val-Lys-Thr-Glu-Tyr-Ile-Lys-Arg-Lys-Ala-Phe-Nle (AG81.5X)、Lys-Asn-Arg-Leu-Thr-Ile-Glu-Leu-Glu-Val-Arg-Thr (A2, A2G73)、Lys-Pro-Arg-Leu-Gln-Phe-Ser-Leu-Asp-Ile-Gln-Thr (A3G72)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (A4G82)、Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Nle (A4G82X)、Gly-Pro-Leu-Pro-Ser-Tyr-Leu-Gln-Phe-Val-Gly-Ile (A5G71)、Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Met-Leu-Val-Arg-Pro (A5G73)、Arg-Asn-Arg-Leu-His-Leu-Ser-Nle-Leu-Val-Arg-Pro (A5G73X)、Leu-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His-Phe-Val-Ala (A5G77) またはLeu-Val-Leu-Phe-Leu-Asn-His-Gly-His (A5G77f) 等が、また、ヒトのLN由来である、Lys-Asn-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Tyr-Leu-Ser-Lys-Gly (hA3G75) またはGly-Asn-Ser-Thr-Ile-Ser-Ile-Arg-Ala-Pro-Val-Tyr (hA3G83) 等が例示される。かかる細胞接着ペプチドは、通常のペプチド合成法により入手可能である。

疎水結合性吸着ポリマーとしては、分子内に疎水性を有する直鎖状炭素骨格と

ペプチドと反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーであって、以下の一般式 [I]

【化 3】



(式中、XはCHまたはNHCHCOを示し、YはCHまたはNCR²COを示し、R¹はH、炭素数1～3のアルキル基、炭素数1～3のアルコキシ基、炭素数6～8のアリールまたはアラアルキル基または炭素数6～8のアリールオキシまたはアラアルキルオキシ基を示し、R²はHまたは炭素数1～3のアルキル基を示し、Zは官能基(反応基)を示し相互に結合してもよく、spacerは(—CH₂—CH₂—)_pまたは(—NHCHR³CO—)_qを示し、R³はHまたは炭素数1～3のアルキル基を示し、mは1以上の整数を、nは100～20000の整数を、pおよびqは独立して0または1～8の整数を、rは1以上の整数を示す)で表され、一般式 [I] 中、炭素数1～3のアルキル基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基等を、炭素数1～3のアルコキシ基としては、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基等を、炭素数6～8のアリールまたはアラアルキル基としては、フェニル基、ベンジル基、フェネチル基を、炭素数6～8のアリールオキシまたはアラアルキルオキシ基としては、フェノキシ基、ベンジロキシ基、フェネチロキシ基等を挙げることができる。

【0015】

かかる疎水結合性吸着ポリマーとしては、細胞培養基質表面に吸着することができる疎水結合性吸着ポリマーであって、分子内にポリアルキレン鎖あるいは直鎖状アミノ酸ポリマー(ポリグリシン、ポリアラニン、ポリバリン、ポリロイシン、ポリフェニルアラニン等)やその誘導体などの疎水性の直鎖状骨格をもつ疎

水結合性吸着ポリマーで、該疎水性の直鎖状骨格に直接、あるいは、スパーサーを介してペプチドと反応できる反応性の官能基（反応基）とを有する疎水結合性吸着ポリマーを好適に用いることができる。かかる一般式〔I〕における n の範囲としては 100～20000 であり、一般式〔I〕で表される疎水結合性吸着ポリマーの分子量は 15,000～3,200,000 程度のものが好ましい。

【0016】

上記反応基としては、ペプチドの官能基と反応して結合しうるものであれば特に制限されるものではなく、例えば、カルボキシル基、アミノ基、メルカプト基、水酸基およびこれらの反応性誘導体等を例示することができる。また、ペプチドの官能基としては、ペプチドの末端あるいは側鎖由来の上記と同様のカルボキシル基、アミノ基、メルカプト基、水酸基およびこれらの反応性誘導体等を例示することができる。ペプチドの官能基と疎水結合性吸着ポリマーの反応基と反応し結合させる方法は、通常のペプチド合成に用いられている方法が利用できる。例えば、カルボキシル基は、縮合剤の存在下に、あるいは酸ハロゲン化物、酸無水物、活性エステル等の反応性誘導体として、アミノ基、メルカプト基あるいは水酸基と反応させることが出来る。上記酸無水物の反応基としては、無水マレイン酸基を好適に例示することができ、ペプチドの N 末端アミノ基、または、アミノ酸側鎖、例えば、リジンε-アミノ基、メルカプト基、水酸基等の官能基と結合する。アミノ基は、縮合剤の存在下に、あるいはイソシアナート等の反応性誘導体として、カルボキシル基と反応させることが出来る。メルカプト基は蛋白質あるいはペプチドのメルカプト基と主として反応し、時には、S-S 結合と S-S 交換反応で結合することもある。また、水酸基は、カルボキシル基と上記と同様に、縮合剤あるいはカルボキシル基の反応性誘導体と反応させることができる。そして、かかる反応基あるいは官能基に、前記疎水性の直鎖状骨格とコポリマーを形成することができる範囲内で、簡単に外れる可逆的な保護基をつけることもできる。

【0017】

かかる反応基を有する疎水結合性吸着ポリマーとしては、エチレン、プロピレン等のアルキレンや、メチルビニルエーテル、エチルビニルエーテル、エチルー

1-プロペニルエーテル等の不飽和エーテルや、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン等の α アミノ酸等などから選択できる1種又は2種以上と、無水マレイン酸、マレインイミド等の無水カルボン酸や酸イミドや、アクリル酸、アクリルアミド、アクリロニトリル等のオレフィン類や、システイン等のメルカプト基を有するアミノ酸や、セリン、スレオニン等の水酸基を有するアミノ酸や、アスパラギン酸、グルタミン酸等のモノアミノジカルボン酸や、リシン等のジアミノモノカルボン酸などから選択できる1種又は2種以上との共重合体を挙げることができる。これらの共重合体はそれぞれ二量体、三量体等が相互に重合した共重合体であってもよいが、交互共重合体であることが好ましい。また、メルカプト基あるいは水酸基を有するアミノ酸、モノアミノジカルボン酸、ジアミノモノカルボン酸等の場合は、これらの単縮重合体は、縮合により形成される疎水性の直鎖状骨格に官能基を有する構造となるため、本発明の反応基を有する疎水結合性吸着ポリマーとして適用することができる。

【0018】

これらのうちで、本発明の反応基を有する疎水結合性吸着ポリマーとして、無水マレイン酸と、メチルビニルエーテル、エチルビニルエーテル、エチルー1-プロペニルエーテル等の不飽和エーテルとの交互共重合体が代表例として例示され、特に、無水マレイン酸とメチルビニルエーテルとの交互共重合体であるMMAC (methyl vinyl ether / maleic anhydride copolymer) を具体例として挙げることができる。MMAC等の場合、メチレン基を骨格とする直鎖ポリマーが、細胞培養基質表面に疎水性結合で吸着することを可能にしているが、ポリアルキレン骨格だけだとあまりにも疎水性で、水との親和性が低くなり、微視的には水をはじいて、反応性に支障がでる可能性があり、そこで、メチレン基の水素原子の一部を上述のように、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基等のアルコキシ基や、フェノキシ基、ベンジルオキシ基、フェネチルオキシ基等で置換したものは、酸素原子の存在により反応効率が高まると考えられる。なお、アルコキシ基に代えて水酸基で置換すると、分子間で無水カルボン酸とエステル結合を作ることから好ましくない。そして、MMACにおける反応基である無水マレイン酸は、ペプチドのアミノ基または水酸基と結合するこ

とになるが、この無水マレイン酸がたとえ水と反応してカルボン酸になったとしても、ペプチドの陽電荷とイオン結合することができる。

【0019】

そして、上記疎水結合性吸着ポリマーは、疎水性の直鎖状骨格により、化学結合でなく疎水性結合で細胞培養基質表面に吸着されることから、細胞培養基質の種類や材質に関係なく吸着することができ、かかる疎水結合性吸着ポリマーを介して、細胞培養基質表面に細胞接着ペプチドを接着し、その上に人工組織を形成させると、所望時に細胞培養基質表面から人工組織を担持した細胞接着ペプチドを物理的に剥離させることができる。

【0020】

細胞培養基質としては、基材として、例えば、生物製ポリマー、プラスチック、天然または合成ゴム、無機物および金属等を使用した細胞培養基質が挙げられる。

生物製ポリマーとしては、コラーゲン、ゼラチン、セルロース等および生分解性ポリマーのポリ乳酸等が例示される。

プラスチックとしては、熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂何れの樹脂も使用することができ、熱可塑性樹脂としては、例えば、アクリル樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ポリメチルペンテン樹脂またはフッ素樹脂等が、熱硬化性樹脂としては、例えば、フェノール樹脂、尿素樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂またはシリコン樹脂等が例示される。

合成ゴムとしては、例えば、ブタジエンスチレンゴム、ブタジエンアクリロニトリルゴム、ブチルゴム、多硫化系合成ゴム、フッ素ゴムまたはシリコンゴム等が例示されるが、特に、シリコンゴムが好ましい。

無機物としては、ガラス、ヒドロキシアパタイト、シリコン等のIC基材またはカーボンナノチューブ等が例示される。

金属としては、不活性 (i n e r t) な金、白金、チタンあるいはこれらの酸化物等が例示される。

特にガラスについて、今日の様にプラスチックが汎用される以前は、培養基質

としてガラスが使われていた。しかし、接着効率の不安定さや繰り返し使用することによる表面の凹凸等により、現在はプラスチックに取って代わられている。しかし、その光学透明性は、優れた特性であり、本発明は、平坦な表面のガラスまたは表面加工を施したガラスに対しても、適用することができる。

また、細胞培養基質は、培養皿（ウェル）、プリント配線板または人工臓器（例えば、人工血管、人工心肺または人工腎臓等）等に用いられる。

【0021】

細胞接着ペプチドの固相化標品は、細胞培養基質に疎水結合性吸着ポリマーをあらかじめ塗布し、吸着させた後、該ポリマーのペプチドと反応しうる官能基と細胞接着ペプチドとを反応させることにより調製することが出来る。疎水結合性吸着ポリマーを細胞培養基質に塗布する場合には、細胞培養基質表面を侵さない溶媒を用いる必要がある。例えば、細胞培養基質としてプラスチックを用い、MMA Cを塗布する場合、MMA Cはアセトンに易溶であるが、アセトンはプラスチック表面を侵す。しかし、プラスチックを侵さないn-ヘキサンに対しては、MMA Cは難溶性である。このため、極性溶媒でプラスチック表面も侵さないエタノールを用いるのが良い。この様に、MMA Cは、エタノールに可溶のため、アセトン等を必要とするポリマーよりも使い易い上に、塗布後に簡単に風乾できる。また、エタノール溶液等として細胞培養基質表面のコーティング処理に用いる場合のMMA C濃度としては、 $2\mu\text{g}/\text{ml} \sim 1\text{mg}/\text{ml}$ 、特に $10 \sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$ が好適であり、かかるコーティング処理を所望する接着の程度に応じて1～3回繰り返すこともできる。プラスチック表面に疎水結合で吸着されたMMA Cと細胞接着ペプチドとは、室温 $\sim 50^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは 37°C で、pH 7～11の中性ないしアルカリ性で10分～48時間反応させることにより固相化させることが出来る。

【0022】

また、疎水結合性吸着ポリマーのペプチドと反応しうる官能基と細胞接着ペプチドとを予め反応させ、該反応物を細胞培養基質に塗布することにより細胞接着ペプチドの固相化標品調製することが出来る。疎水結合性吸着ポリマーと細胞接着ペプチドとを予め反応させた化合物を使えば、細胞培養基質への疎水結合性吸

着ポリマーのコーティングとペプチドの固相化反応の二段階処理で細胞接着基質を固相化していたのが、該化合物をコーティングする一段階で調製することができる。例えば、該化合物を使用すると、細胞接着させる部分をプリントし、どのように種々の細胞と共培養するかデザイン（配置）出来る様になり、丁度、IC回路を設計する感覚で人工組織を構築することができる。疎水結合性吸着ポリマーと細胞接着ペプチドとの反応、および反応物の細胞接着基質への塗布する方法は、前期の方法に準じて調製することができる。

【0023】

細胞接着ペプチドの固相化標品上に所定の接着受容体を有する細胞を播種し、培養することにより人工組織を調整することが出来る。かかる人工組織の製造方法としては、細胞接着ペプチドの固相化標品上に所定の接着受容体を有する細胞を播種し、培養する方法であれば特に制限されることはなく、固相化標品上に目的の細胞を播種するだけで、播種された細胞は接着し、その後速やかに伸展する。培養液に特に血清は必要ないが、1%程度の低濃度（通常の細胞培養では10%程度使用される）を添加すれば、接着、伸展は更に促進される。

【0024】

所定の接着受容体を有する細胞としては、例えば、上皮細胞、内皮細胞または間充織細胞等を挙げることができ、上皮細胞としては、例えば、表皮細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子球体上皮細胞または肝実質細胞等を、内皮細胞としては、例えば、腎臓子球体毛細胞、血管内皮細胞、肺動脈血管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞、大動脈血管内皮細胞等を、間充織細胞としては、例えば、筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン細胞または神経細胞（ニューロン）等をより具体的に例示することができる。

【0025】

また、細胞接着ペプチド上に形成されるヒト等の人工組織（人工臓器も含む）としては、細胞層とその直下の基底膜を含む組織であればどのようなものでもよいが、例えば、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎糸球体組織、人工肝実質組織、人工血管内皮組織等の人工組織や、人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚、人工角膜等の人工臓器を

具体的に挙げることができる。

【0026】

そして、細胞接着ペプチドの固相化標品上に所定の接着受容体を有する細胞を播種し、培養することにより形成された人工組織は、上記疎水結合性吸着ポリマーが化学結合でなく疎水性結合で細胞培養基質表面に吸着されていることから、細胞培養基質の種類や材質に関係なく吸着することができ、また、所望時には、細胞培養基質表面から物理的に剥離させることができる。剥離された人工組織は、基底膜の構造を保持したままで移植が可能なことから、その汎用性が一層高く、その適用例として、内径 3 mm 以下の微細人工血管や、体内埋込み型のヒト人工組織等を例示することができ、特に、人工子球体、人工肝臓、人工肺胞など上皮組織と内皮組織が近接する組織や臓器を好適に例示することができる。

【0027】

本発明で得られる固相化ペプチドを中性 pH、37℃で4日間放置しても細胞接着活性に変化は無く極めて安定である。このことから、細胞接着ペプチドの固相化標品は、種々の培養基質として用いることができ、その性能は、代表的接着蛋白質である FN と比較しても、十分な活性を有している。また、本発明の調製方法によれば、従来、細胞培養基質に直接ペプチドを固相化するには、細胞接着ペプチドの濃度を 2.5 mg/ml 以上にする必要があるが、本発明では 0.25 mg/ml 以下で十分であり、ペプチドの使用量が、従来法の 1/10～1/100 以下の量でも、効率良く、しかも再現性良く固相化できる。

【0028】

また、インビトロにおける組織や臓器形成あるいは組織再生を行う際に、力学的支持体である細胞培養基質表面に直接細胞を播種するのは、細胞培養基質表面を親水加工しても、長期間細胞剥離を起こさないようにするのは難しく、良い結果は期待できない。そこで、細胞接着ペプチドを細胞培養基質表面に疎水結合性吸着ポリマーを介して固相化し、その上に細胞を播種、増殖させた本発明の人工組織は、成績を著しく向上させることができる。この場合、LN や FN を直接塗布する方法も有るが、次第に細胞培養基質表面から剥がれるので、本発明が有効である。

【0029】

コラーゲン線維は、細胞接着基質として有用であるが、その接着にはインテグリン受容体が関与する。しかし、細胞層直下に基底膜が存在する上皮細胞、内皮細胞等の接着に際してインテグリンが働くのは、正常時の組織構築モデルでなく、むしろ病態時を想定したモデルなので好ましく無く、インビボで通常働いているシンデカンが働く状態での組織構築が望ましい。この為、コラーゲン線維を基底膜の重要主成分ラミニンでコラーゲン線維表面をコーティングしようとしても、実際はコーティングされ難い。この代わりとして、本発明で示した方法でコラーゲン線維をLN α 鎖G領域の接着ペプチドでコーティングすると、インテグリンに代わってシンデカンが働いている組織構築が可能である。

【0030】

セルロースは、安価で十分な強度と半透膜性を持ち、色々な形に整形可能で、かつ生体に馴染み易い工業資材である。しかし、細胞接着に必要な官能基を有していないので、人工臓器や細胞培養の基材に用いるには、細胞接着分子をコーティングする必要がある。しかし、その効率とコーティングした物質の残存性は良くない。この為、非接着細胞の懸濁培養基材に使われるが、接着性細胞の培養基質には不向きだった。今回例示したMMACは、メチレン基が屈曲性に富むのでこの様な素材にも適用でき、例えばホロファイバー状に形成したチューブの内腔面や外表面に本発明のコーティングをすることにより、細胞接着の基材として使用することが可能になる。

【0031】

本発明は、細胞培養に通常使用されるポリスチレン以外にも適用可能である。例えば、医療に使われる人工血管、人工水晶体等、埋め込み型プラスチックの表面に細胞接着ペプチドの固相化処理を施すことにより、患者の細胞が容易に接着できる環境が醸成され、患者の負担軽減が期待できる。

【0032】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1 (細胞接着ペプチドの固相化標品の調製)

全ての操作は無菌操作を前提とする。始めに、エタノールに $25\mu\text{g}/\text{ml}$ のMMACを溶かし、フィルターを通した後に細胞培養用に表面処理をしていない96穴培養皿に $50\mu\text{l}$ ずつ注ぎ、暫く静置後MMACを吸い取って風乾する。次に、 0.1M エタノールアミン緩衝液、 $\text{pH}8.8$ 溶液に $0.25\text{mg}/\text{ml}$ の細胞接着ペプチドを溶かし、先程MMACをコートした96穴培養皿に $50\mu\text{l}$ ずつ注ぐ。 37°C に加温されたインキュベーター内で加湿しながら、一晩反応させる。反応終了後、反応液を吸い取り、残余の反応液を培地でリンスして、細胞接着ペプチドの固相化標品を調製する。該評品は、固相化細胞接着ペプチド基質として、以下の実施例に示すように、細胞培養に供することができる。

なお、細胞接着ペプチドの濃度を、 $1/5$ 量の $0.05\text{mg}/\text{ml}$ にしても、通常の細胞培養に支障は無い。

また、MMACコートだけのときは、96穴培養皿の底面は、無水マレイン酸が加水分解して出来たカルボキシル基の陰電荷のため、細胞はほとんど接着できない。

【0033】

実施例2 (T2細胞の細胞接着ペプチドによる細胞接着蛋白質への接着阻害)

細胞培養の際に、細胞接着蛋白質として通常使用されている市販品のFNおよびLNを各々 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で培養皿に塗布した。C o l I (I型コラーゲン)の場合は、 1mM HClに溶かした $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のC o l Iを培養皿に注ぎ、暫く静置した後、溶液を除いて風乾した。次に、上記の細胞外基質を塗布した96穴培養皿上に、無血清のDMEM培地に懸濁した 6×10^5 個/ ml の肺胞II型上皮細胞(T2細胞)を $100\mu\text{l}$ ずつ播種し、 CO_2 インキュベーター内で、 37°C 、1日間培養した。培養終了後、メタノール $100\mu\text{l}$ で細胞を5分間固定し、 0.4% クリスタルバイオレット $50\mu\text{l}$ で30分間細胞を染色した。過剰な染色は水洗し、細胞質の吸光度(A_{595})から、培養皿に塗布されたFN、C o l IおよびLNに接着した細胞数を計測した。

【0034】

他方、種々のLN分子のアミノ酸配列の中には、細胞接着を誘引する配列の存在が知られている。合成した何種類かの細胞接着ペプチドを、上記と同様にして調製した細胞培養液に、 0.25 mg/ml の濃度で添加した。以下、上記の方法に準じて細胞数を計測した。その結果を図1に示す。

【0035】

細胞接着ペプチドの内、特に、AG-73、A3G-72、hA3G-75、hA3G-83、A4G-82、A5G71およびA5G-77ペプチドが、T2細胞の接着を阻害した。これは、これらのペプチドが、細胞に強い親和性を有し、T2細胞が、FN、ColIおよびLNに接着することを阻害したためと理解される。

【0036】

なお、FIB-1ペプチドは、FNへの接着を阻害する（通常は、 1 mg/ml 以上必要）ペプチドとして知られているが、FIB-1ペプチドが阻害作用を発揮しない 0.25 mg/ml という低濃度でも、上記ペプチドは阻害活性を示している。AG73の様に、LNペプチドの種類によっては、 0.12 mg/ml の濃度でも同じく阻害活性を示した。

【0037】

実施例3（T2細胞の固相化細胞接着ペプチド基質に対する接着）

実施例1の方法に準じて調製した細胞接着ペプチドが固相化された培養皿に、無血清のDMEM培地に 6×10^4 個/ $100\text{ }\mu\text{l}$ の濃度に懸濁したT2細胞を播き、CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養した。以下、実施例2の方法に準じて、メタノールで固定、染色後、吸光度を測定した。別途、細胞を播種する直前に、固相化に使用されている細胞接着ペプチドと同一の遊離ペプチドを細胞懸濁液に添加し、以下、上記と同様に培養後、吸光度を測定した。標準物質としてFNを塗布した場合についても、併せて測定した。結果を図2に示す。

【0038】

図2中、Controlは、固相化細胞接着ペプチドが存在するのみであり、free pepは、固相化細胞接着ペプチドと同一の遊離ペプチドが、 0.2

5 mg/ml で共存している系を示す。

細胞接着ペプチドを培養皿に固相化する (immobilized、anchored) と、T2 細胞との親和性により、細胞接着の足がかりになることを示している。この時、遊離ペプチドを添加した場合には、遊離のペプチドは固相化ペプチドと競合し、その結果細胞接着が阻害されることを示している。即ち、固相化されたペプチド (例えば、AG-73、A3G-72、hA3G-75、hA3G-83、A4G-82、A5G71 および A5G-77 ペプチド等) と T2 細胞との接着は、特異的結合によって、即ちリセプターを介して行われていることを示唆する。

【0039】

実施例 4 (固相化細胞接着ペプチド基質に対する T2 細胞の細胞接着・伸展の時間経過/人工組織の調製)

培養皿に固相化された細胞接着ペプチドおよび T2 細胞を用い、実施例 3 の方法に準じて、1～24 時間培養した。培養後の細胞接着と伸展の様子を微分干渉 (光学) 顕微鏡で観察した。培養 1、6 および 24 時間後の結果を図 3 に示す。

図 3 では、T2 細胞を固相化した細胞培養基質上で、1 時間 (A～C)、6 時間 (D～L)、および 24 時間 (M～O) 培養後の微分干渉顕微鏡写真を示している。

【0040】

細胞接着ペプチドとして、B、E および M は AG73 を、C、L および O は FIB-1 を、F は A3G72 を、G および N は A4G82 を、H は A5G71 を、I は A5G77 を、J は hA3G75 を、K は hA3G83 を、また、A および D は標準物質として FN を使用した。

FN より若干劣るが、1 時間で細胞は接着し、一部の細胞では伸展を開始している。6 時間の培養では、FN と比べて遜色なく、AG73、A3G72 および A4G82 ペプチド上で伸展している。hA3G75 および hA3G83 ペプチド上では、伸展は遅れているが十分接着している。24 時間では、AG73、A4G82 および FIB-1 共に、FN 上に播種した場合と同様 (図には示していない) に、殆どの細胞が伸展を完了している。

【0041】

実施例 5 (固相化細胞接着ペプチド基質に対する T2 細胞のヘパリンによる接着阻害)

実施例 1 の方法に準じて調製した固相化した細胞接着ペプチドを $100 \mu\text{g/ml}$ のヘパリン溶液に浸す (Hep:well) だけや、さらには、実施例 3 に準じて調製した培養液にも添加する (Hep:well & cell) 処理をした後に、肺胞上皮細胞を播種し、24 時間培養した後の接着細胞数についての結果を図 4 に示す。

実施例 3 から、T2 細胞と固相化された接着ペプチドとの結合が特異的という結果が得られたことより、T2 細胞の結合部位 (受容体、リセプター) を明らかにする目的で本実験を行った。

【0042】

ある固相化したペプチドの場合は、細胞接着が阻害される。このことは、固相化ペプチドとヘパリンとが親和性を以て結合したため、細胞表面に局在するヘパリンと類似の糖鎖構造を有するシンデカン (ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種で、細胞表面に微量に存在) と細胞接着ペプチドとの本来の結合が競合阻害されたと理解される。

【0043】

このことから、AG73、AG73T、AG81.5、A3G72、A4G82、hA3G75、hA3G83 の結合相手は、細胞表面のシンデカンである。A5G71、A5G77 と T2 細胞との結合は特異的かも知れないが、その相手はシンデカンでは無いのか、ヘパリンで阻害されない新奇のタイプかは不明である。

【0044】

実施例 6 (固相化細胞接着ペプチド基質に対する T2 細胞接着の競争阻害)

実施例 2 の方法に準じて、固相化した細胞接着ペプチド上で T2 細胞を培養する際に、固相化ペプチドとは異なる遊離ペプチドを添加した結果を図 5 に示す。

固相化したペプチドを同じペプチドを培養液に遊離の状態に添加すると、両者は T2 細胞のシンデカンを巡って競争し、その結果細胞接着が阻害される (実施例 2 参照)。現在、シンデカンには遺伝的に 4 種類の存在が知られている。ここ

では、それぞれのペプチドに対するシンデカンが、互いに共有（融通）し合っている（common）のか、有る程度の範囲で重複しているだけか、それとも互いに排他的なのかを検討した。

【0045】

例えば、AG73を固相化した場合、遊離状態のAG73以外にも、A3G72、A4G82、A5G71、A5G77、hA3G72、hA3G83が細胞接着を阻害していることから、互いにリセプターを共有し合っていることを示唆している。しかし、AG81.5、AG73Tは阻害できない。

また、AG81.5やAG73Tを固相化した場合は、遊離のAG81.5やAG73Tは自分自身の固相化ペプチドと競争阻害できないか、できても極わずかである。しかし、上記のLNペプチドによって、細胞接着が阻害されている。

【0046】

この結果は、お互いのペプチドはリセプターを共有（融通）し合っていることを示している。しかし、その共有（融通）は対等では無く、ペプチド間で受容体との親和性に順位が存在することを伺わせる。即ち、AG73、A3G72、A4G82、A5G71、A5G77、hA3G75、hA3G83 > AG81.5、AG73T。なお、AG73Tは、AG73のアミノ酸配列を入れ替えて作った人工の配列で、天然には存在しない。

【0047】

FIB-1のリセプターは、シンデカンではなく、インテグリンと呼ばれる細胞接着分子である。そのインテグリンとFIB-1との結合が、AG73等のLNペプチドで阻害されるが、その逆は無い。即ち、FIB-1を固相化した場合は、遊離のLNペプチドで阻害が掛かるが、AG73等を固相化した場合は、遊離のFIB-1で阻害が全く掛からない。このことは、細胞接着においてインテグリンを介する細胞接着よりもシンデカンを介した細胞接着が優先されることを示している。この点でも、LN α 鎖G領域の細胞接着ペプチドを固相化して細胞接着基質とすることの利点が明瞭である。

【0048】

【発明の効果】

本発明によると、本発明の細胞接着ペプチドの固相化標品は、細胞接着蛋白質を固相化した標品に比して構造的に安定で、安価であることより、細胞接着蛋白質の代替標品として極めて有用である。また、その性能は代表的接着蛋白である FN と比較して、十分な活性を有する。LN α 鎖G領域の接着ペプチド (AG73、AG73T、AG81.5、A3G72、hA3G75、hA3G83、A4G82) に対して、肺胞上皮細胞が細胞表面のシンデカン受容体を介して接着した。LN は上皮細胞、血管内皮細胞、筋肉細胞、神経細胞等が機能発現するに必要な基質と考えられており、その接着にはインテグリン受容体以外にシンデカン受容体も関与すると考えられている。構造的に安定でしかも安価な固相化 LN α 鎖G領域ペプチドは、LN 代替物質として極めて有効である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

T2 細胞の細胞接着ペプチドによる細胞接着蛋白質への接着阻害を示した図である。

【図 2】

固相化細胞接着ペプチド基質に対する T2 細胞の接着とその接着が遊離ペプチドにより競争阻害を受けることを示した図である。

【図 3】

細胞接着ペプチドを固相化した細胞培養基質上における肺胞上皮細胞の細胞接着、伸展の様子を微分干渉顕微鏡で撮影した写真を示す図である。

【図 4】

固相化細胞接着ペプチド基質に対する T2 細胞の接着がヘパリンによって阻害を受けることを示した図である。

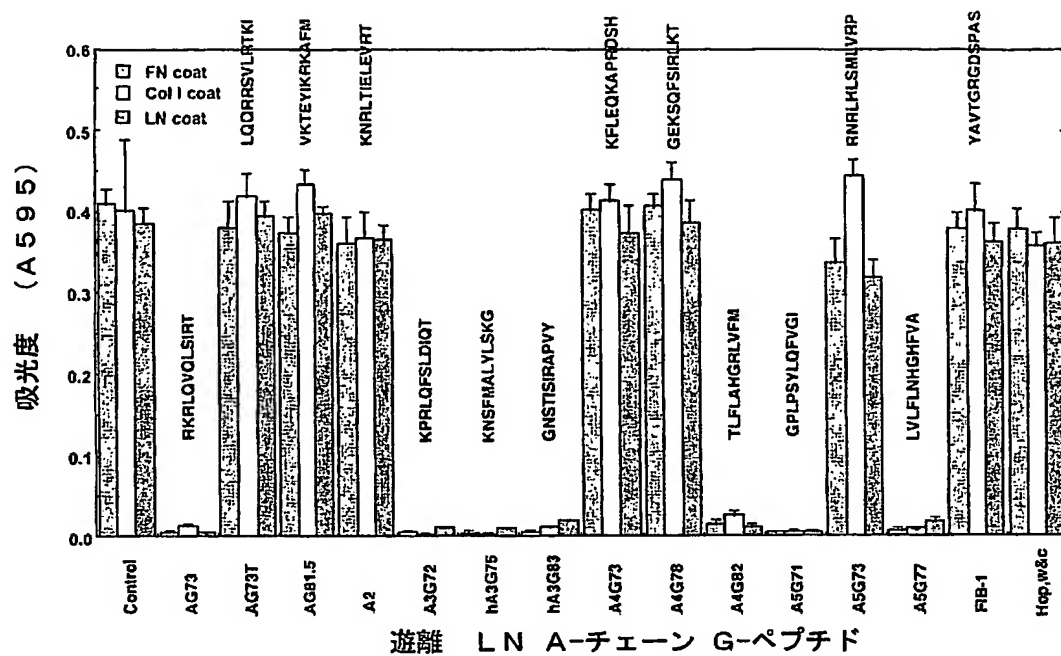
【図 5】

固相化細胞接着ペプチド基質に対する T2 細胞の接着は、お互いに遊離ペプチドで競争阻害を受ける場合と一方的に競争阻害を受ける場合があることを示した図である。

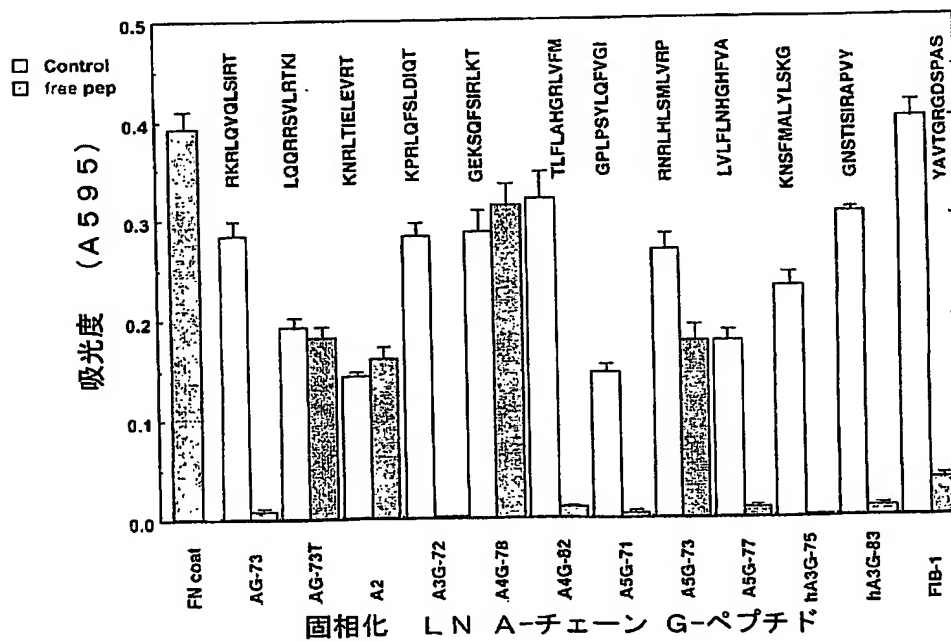
【書類名】

図面

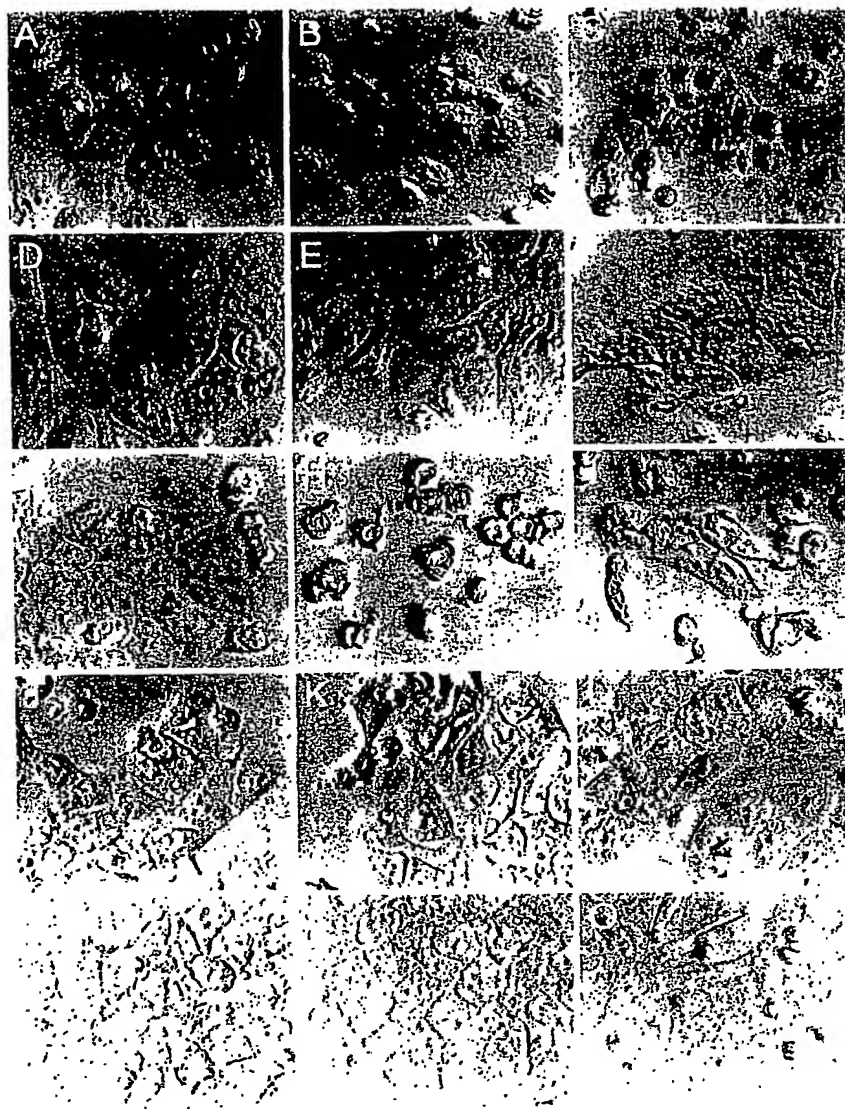
【図1】



【図2】

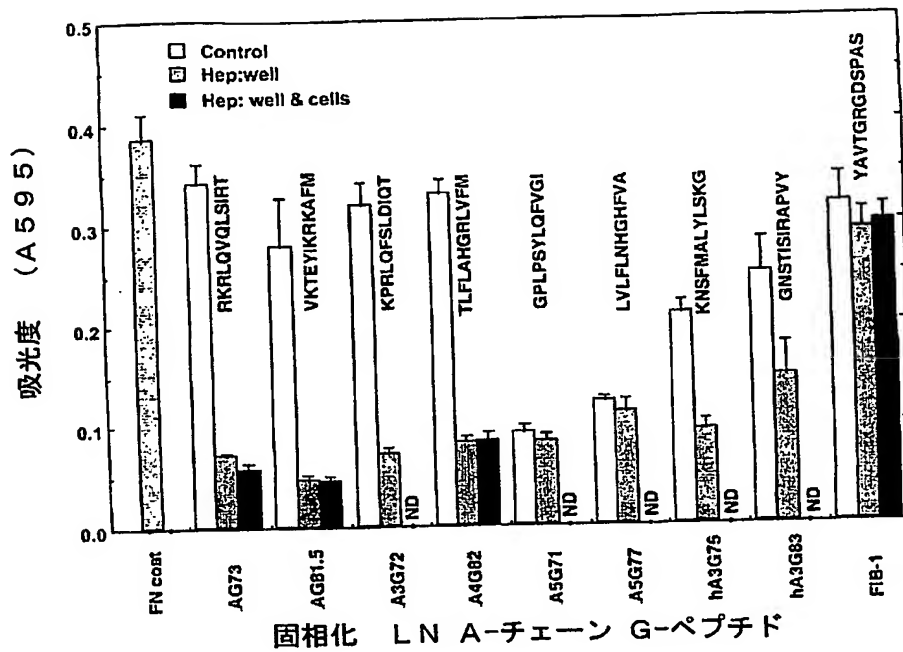


【図3】

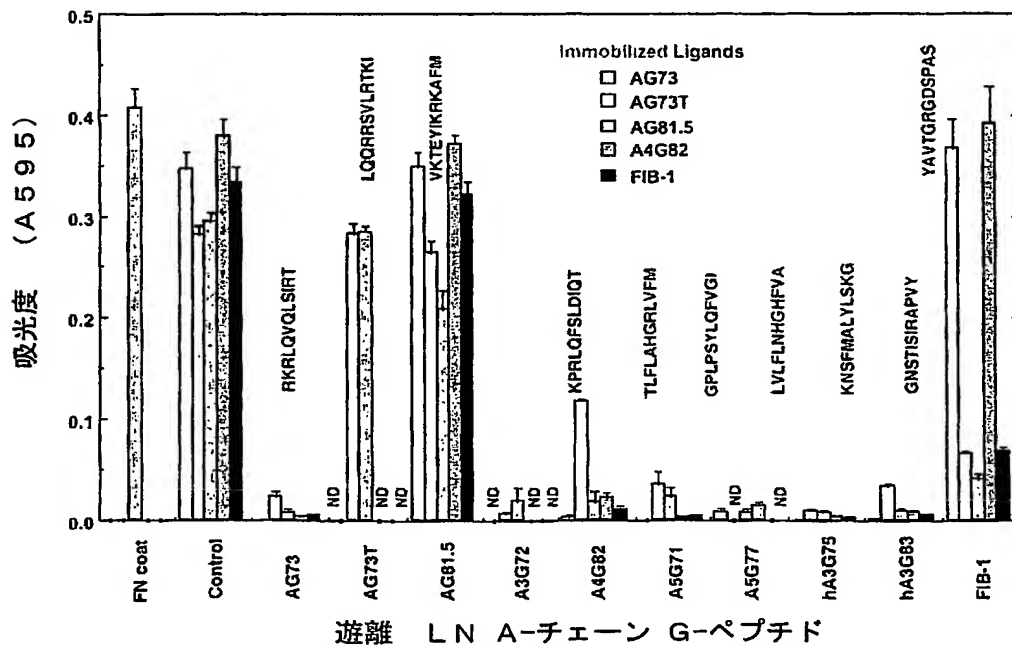


BEST AVAILABLE COPY

【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 培養皿等の細胞培養基質に効率よく吸着し、細胞接着の再現性に優れた細胞接着ペプチドの固相化標品、および、該細胞接着ペプチドの固相化標品上に細胞を播種し、培養することにより調製される人工組織を提供する。

【解決手段】 細胞接着ペプチドが、疎水結合性吸着ポリマーを介して細胞培養基質に接着していることを特徴とする細胞接着ペプチドの固相化標品、および、該細胞接着ペプチドの固相化標品上に細胞を播種し、培養することにより調製される人工組織を提供する。

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 2003P1587

【提出日】 平成15年 6月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

 【出願番号】 特願2003- 81147

【承継人】

 【持分】 010/100

 【識別番号】 501273886

 【氏名又は名称】 独立行政法人国立環境研究所

 【代表者】 合志 陽一

【承継人代理人】

 【識別番号】 100107984

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-081147
受付番号	50300983664
書類名	出願人名義変更届
担当官	神田 美恵 7397
作成日	平成15年 7月22日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	501273886
【住所又は居所】	茨城県つくば市小野川16-2
【氏名又は名称】	独立行政法人国立環境研究所

【承継人代理人】

申請人	
【識別番号】	100107984
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	廣田 雅紀

特願 2003-081147

出願人履歴情報

識別番号

[503108883]

1. 変更年月日
[変更理由]
住所
氏名

2003年 3月24日
新規登録
茨城県つくば市竹園3-108-404
持立 克身

特願 2003-081147

出願人履歴情報

識別番号

[501273886]

1. 変更年月日

2001年 7月10日

[変更理由]

新規登録

住所

茨城県つくば市小野川16-2

氏名

独立行政法人国立環境研究所